

①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

①2 **Offenlegungsschrift**  
①0 **DE 199 37 219 A 1**

⑤1 Int. Cl. 7:  
**C 07 K 14/435**  
C 07 K 1/22  
C 12 N 9/14  
C 12 Q 1/56

②1 Aktenzeichen: 199 37 219.5  
②2 Anmeldetag: 6. 8. 1999  
④3 Offenlegungstag: 8. 2. 2001

Aventis Behring GmbH Intellectual Property/Legal	
Abl.: 1999/2011-FA DR	Erl.: 19
13. Feb. 2001	
Lp OK	Pfe OK
Dr. Römisch /rm	

DE 199 37 219 A 1

⑦1 Anmelder:  
Aventis Behring GmbH, 35041 Marburg, DE

⑦2 Erfinder:  
Römisch, Jürgen, Dr., 35041 Marburg, DE; Stöhr,  
Hans-Arnold, 35083 Wetter, DE; Feußner, Annette,  
35043 Marburg, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤4 Verfahren zur Reindarstellung der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease, ihres Proenzym oder eines Gemisches beider Proteine mittels Ionenaustauscherchromatographie

⑤7 Es wird ein Verfahren zur Reindarstellung der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease und/oder ihres Proenzym beschrieben, bei dem diese aus biologischen oder bei der gentechnologischen Herstellung anfallenden Flüssigkeiten

a) durch Anionen- oder Kationenaustauscher-Chromatographie bei einem pH-Wert unterhalb des isoelektrischen Punktes des zu isolierenden Proteins oder

b) durch eine Kombination der Anionen- oder Kationenaustauscher-Chromatographie mit der Affinitätschromatographie und/oder einer fraktionierten Fällung bei pH-Werten zwischen 2,5 und 9,0, vorzugsweise zwischen 2,5 und 7,2 gewonnen werden, wobei die Affinitätschromatographie unter Verwendung von

- Kalziumphosphat/Hydroxylapatit,
- einer hydrophoben Matrix,
- einer Chelatmatrix,

- einer Matrix, die mit einem immobilisierten, gegen das zu isolierende Protein gerichteten, monoklonalen oder polyklonalen Antikörper oder seinen F(ab)- oder F(ab) 2-Fragmenten beschichtet ist, durchgeführt wird.

Es werden außerdem eine pharmazeutische Zubereitung und ein Reagenz beschrieben, die die genannte Protease und/oder ihr Proenzym enthalten.

AVENTIS BEHRING

16. Feb. 2001

EDV

DE 199 37 219 A 1

## Beschreibung

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Reindarstellung der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease, ihres Proenzyms oder eines Gemisches beider Proteine sowie von pharmazeutischen Zubereitungen, die die genannten Proteine einzeln oder im Gemisch enthalten.

Aus der deutschen Patentanmeldung 199 03 693.4 ist bereits eine Protease zur Aktivierung des Blutgerinnungsfaktors VII, ein Verfahren zu ihrer Gewinnung, zu ihrem Nachweis und zu ihrer Inaktivierung sowie Arzneizubereitungen bekannt, die diese Protease enthalten. Diese zuerst aus Plasma isolierte Protease kommt dort zusammen mit einer nicht-aktivierten Form vor, die im folgenden als "Proenzym" bezeichnet wird. Die Protease aktiviert den Blutgerinnungsfaktor VII und beschleunigt die Gerinnung, wie durch zahlreiche Experimente gezeigt werden konnte. Bei der weiteren Untersuchung der biologischen Eigenschaften dieses als Serin-Protease identifizierten Proteins stellte sich heraus, dass auch Einketten-Plasminogen-Aktivatoren wie die 5 Prourokinase wirksam aktiviert werden. Außerdem wurde eine Inaktivierung der Faktoren V und VIII in vitro beobachtet. Zusätzlich zu den schon in der deutschen Patentanmeldung 199 03 693.4 beschriebenen sequenzierten Bereichen wurden N-terminale Sequenzierungen von Proteasefragmenten durchgeführt. Folgende Aminosäuresequenzen charakterisieren die FVII-aktivierende Protease: IYGGFK-STAGKHP; LLESLDPDXTDP; EFHEQSFRVEKI; SKFTXAXPXQFK; wobei X nicht identifiziert bedeutet. Die bisher aufgeklärten Sequenzen der genannten Protease 30 zeigen, dass sie zu 100% mit Sequenzen der von Choi-Miura publizierten Protease übereinstimmen (Choi-Miura et al. J. Biochem. 1996; 119: 1157 bis 1165).

Die bisherigen Untersuchungen haben sich vor allem auf die Protease in ihrer aktivierten Form konzentriert. Die im Plasma als Proenzym vorliegende inaktive Form der Protease wurde erst vor kurzer Zeit anhand eines Protein-Bandenmusters in der SDS-PAGE nach Reduktion der Probe aufgefunden. Da bei der Aktivierung der Protease an einer für Serinproteasen typischen Stelle der Primärstruktur eine Spaltung und damit Aktivierung erfolgt, werden bei der Elektrophorese zwei oder mehr Banden sichtbar. Bei Reduktion der über Disulfidbrücken verbundenen Ketten werden die einzelnen Banden entsprechend ihrem niedrigerem Molekulargewicht erkennbar, wobei das Proenzym als große Einzelkette verbleibt. Dies wurde auch in komplexen Lösungen nach Transfer der Proteine auf Membranen und anschließendes Western Blotting mit geeigneten Antikörpern deutlich.

Aus therapeutischen Gründen besteht nun ein Interesse daran, außer dem Gemisch der beiden genannten Proteine sowohl die Protease in ihrer aktivierten Form als auch das Proenzym zur Verfügung zu haben. Während man die aktivierte Protease zur raschen Aktivierung des Blutgerinnungsfaktors VII oder der Einketten-Plasminogenaktivatoren verwenden kann, um akute Krankheitsbilder zu beeinflussen, ist die Proenzymform der Protease vor allem für die mittel- bis längerfristige Prophylaxe oder Behandlung von angeborenen oder erworbenen Mangelzuständen oder auch zur Erhöhung des Plasmaspiegels über das physiologische Maß hinaus als bevorzugtes Mittel zu wählen. Dabei ist aber zu berücksichtigen, dass die Stabilisierung einer aktivierten Protease schwierig ist, da z. B. eine Eigendegradation stattfinden oder das Molekül aufgrund seiner strukturellen Gegebenheiten instabil sein kann. Bisherige Studien zeigten, dass die den Faktor VII aktivierende Protease nur unter besonderen Umständen in ihrer Proenzymform isoliert und stabilisiert werden kann.

Die bisher vorliegenden Untersuchungen haben gezeigt, dass die biologischen Aktivitäten dieser Protease durch Kalzium und/oder Heparin oder diesem verwandte Substanzen gesteigert werden können. Diese Eigenschaft wurde schon 5 bisher genutzt, um die Protease an immobilisiertes Heparin zu adsorbieren und eine angereicherte Fraktion zu erhalten. Außerdem ist bereits bekannt, dass die Anionenaustauscher-Chromatographie ebenfalls zur Reinigung der Protease geeignet ist. Die Kombination beider Reinigungsschritte ist 10 geeignet, die Protease in angereicherter Form zu gewinnen. Auch die Verwendung einer Aprotinin-Matrix kann zur Reindarstellung der aktivierten Protease verwendet werden.

Es wurde nun ein Verfahren zur Reindarstellung und gleichzeitigen Stabilisierung der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease und/oder ihres Proenzyms gefunden, bei dem sie aus biologischen oder den bei der gentechnologischen Herstellung anfallenden Flüssigkeiten durch

- a) Anionen- und/oder Kationenaustauscher-Chromatographie bei einem pH-Wert unterhalb des isoelektrischen Punktes des zu isolierenden Proteins oder
- b) eine Kombination der Anionen- oder Kationenaustauscherchromatographie mit einer Affinitätschromatographie und/oder einer fraktionierten Fällung bei pH-Werten zwischen 2,5 und 9,0, vorzugsweise zwischen 2,5 und 7,2, gewonnen werden, wobei die Affinitätschromatographie unter Verwendung von
  - Kalziumphosphat/Hydroxylapatit
  - einer hydrophoben Matrix,
  - einer Chelatmatrix,
  - einer Matrix, die mit einem immobilisierten, gegen das zu isolierende Protein gerichteten, monoklonalen oder polyklonalen Antikörper oder seinen F(ab)- oder F(ab)<sub>2</sub>-Fragmenten beschichtet ist, durchgeführt wird.

Eine besonders geeignete Methode zur Reindarstellung der Protease und/oder ihres Proenzyms ist die Anionen- und/oder Kationenaustauscher-Chromatographie. Der Einsatz dieser Methoden zur Reindarstellung der aktivierten Protease ist zwar schon früher vorgeschlagen worden, jedoch haben die bisher angewendeten Verfahrensbedingungen keine voll befriedigenden Ergebnisse erbracht. Das liegt vor allem daran, dass das Risiko der Aktivierung des Proenzyms bei der Kontaktierung mit den Oberflächen der Matrices sehr hoch ist. Es stellte sich deshalb die Aufgabe, ein Verfahren zu entwickeln, das die Reindarstellung der aktivierten Protease und des Proenzyms in reiner und stabiler 50 Form ermöglicht.

Überraschenderweise zeigte sich nun, dass sehr niedrige pH-Werte, insbesondere pH-Werte zwischen 2,5 und 7,2 weder der aktivierten Form der Protease noch dem Proenzym schaden und deshalb bei der Adsorption und Elution mit gutem Erfolg eingesetzt werden können. Hierdurch wird eine nahezu störungsfreie Handhabung der den Faktor VII aktivierenden Protease ermöglicht, da die meisten anderen im Plasma zirkulierenden Proteasen im sauren Medium nicht oder nur sehr wenig aktiv sind und damit das Risiko einer proteolytischen Aktivierung minimiert wird. Auch die Gefahr des Eigenabbaus der Protease wird auf diese Weise vermindert. Da bekanntlich extrem saure pH-Werte das Risiko einer Denaturierung beinhalten und damit einen Aktivitätsverlust der Protease bewirken könnten, wurde die Aktivität der aus einem stark sauren Medium gewonnenen Protease z. B. durch eine photometrische Bestimmung der bei der Einwirkung auf chromogene Substrate auftretenden Extinktion gemessen. Dabei konnte gezeigt werden, dass so-

wohl die Protease als auch ihr Proenzym kurzfristig bis zu einem pH-Wert von 2,0 ohne Aktivitätsverlust gehandhabt werden können. Bei einem pH-Wert von 2,5 bis etwa 7,2 können die Protease und ihr Proenzym über mehrere Monate gelagert werden, wobei die höchsten Stabilitäten bei einem pH-Wert von unter 6,5 beobachtet werden.

Überraschend war dabei der Befund, dass eine Anionen- und/oder Kationenaustauscher-Chromatographie bei den genannten niedrigen pH-Werten zur Reinigung der Protease und des Proenzym verwendet werden kann. Dies ist deshalb so bemerkenswert, weil dabei eine Adsorption an den Austauscher-Matrices bei pH-Werten möglich wird, die unterhalb des isoelektrischen Punktes der Protease oder des Proenzym liegen.

Bisher gibt es noch keine wissenschaftliche Erklärung dafür, auf welchen Wechselwirkungen diese Adsorption beruht. Es gelingt jedoch durch diese Adsorption im sauren Medium eine Vielzahl von Verunreinigungen zu entfernen, die bei diesen pH-Werten nicht an die Matrices binden. Damit wird eine erhebliche Anreicherung der Protease auf der Matrix erzielt. Nach Waschen der Matrix kann die Protease und/oder das Proenzym durch eine Erhöhung der Ionenstärke eluiert werden.

Die Anionen- und/oder Kationenaustauscher-Chromatographie können zur Reindarstellung der vorstehend genannten Proteine mit einer Affinitätschromatographie und/oder einer fraktionierten Fällung kombiniert werden. Unabhängig davon, ob die vorstehend genannten Reinigungsverfahren einzeln oder in einer beliebigen Kombination eingesetzt werden, empfiehlt es sich, zusätzlich bei allen Verfahrensschritten Protease-Inhibitoren zuzusetzen, um eine Spaltung des Proenzym in die aktivierte Protease zu blockieren. Als geeignete Proteinstabilisatoren werden dabei

- Lösungsvermittler, vorzugsweise Hydroxyprolin,
- Detergentien, vorzugsweise Tween® oder Triton®,
- Proteine, vorzugsweise Albumin, Gelatine, Fibronectin und Vibronectin oder ähnlicher Proteine,
- Reduktionsmittel, vorzugsweise Dithiothreitol, Mercaptoethanol oder Cystein, und/oder
- Proteinase-Inhibitoren wie Aprotinin,  $\alpha$ -2-Antiplasmin, C1-Esterase-Inhibitor, Inter- $\alpha$ -Trypsin-Inhibitor, AntithrombinIII/Heparin oder synthetische Inhibitoren

zugesetzt.

Eine besonders gute Stabilisierung lässt sich bei der Reindarstellung der Protease und des Proenzym erreichen, wenn als weitere Proteinstabilisatoren

- Komplexbildner zweiwertiger Ionen, vorzugsweise EGTA, EDTA oder Citrat, und/oder
- zweiwertige Ionen, vorzugsweise Kalziumionen, und/oder
- Aminosäuren, vorzugsweise Glutamat, Arginin, Lysin oder Glyzin, und/oder
- Zucker, vorzugsweise Glukose, Arabinose, Mannose oder Mannit, und/oder
- Alkohole, vorzugsweise Ethylenglykol oder Polyethylenglykol, zugesetzt werden.

Die vorstehend genannten Verfahrensschritte können darüber hinaus auch mit einer fraktionierten Fällung der Protease und/oder ihres Proenzym kombiniert werden, die aus ihrer Lösung durch Zusatz von

- Polyethylenglykol ab einer Konzentration von mindestens 10 Gew.-% oder
- Ammoniumsulfat ab einer Konzentration von min-

destens 15 Gew.-% erfolgt.

Besonders bemerkenswert ist, dass bei den vorstehend beschriebenen Verfahren auch die Proenzymform der Protease in reiner Form erhalten werden kann. Es zeigte sich nämlich, dass die Ionenaustauscher-Chromatographie unter den genannten sauren Bedingungen mit einer Lösung, die vor allem das Proenzym enthielt, zu einem Eluat führte, das ausschließlich das Proenzym oder wenigstens in sehr stark angereicherten Ausmaß enthielt. Dabei lässt sich die Nativität des so erhaltenen Proenzym mit Hilfe eines der Aktivitätsteste bestimmen, die in der deutschen Patentanmeldung 196 26 531.3 beschrieben sind, also z. B. durch die photometrische Bestimmung der bei Einwirkung auf chromogene Substrate auftretenden Extinktion oder durch die nach Reduktion der Probe auftretende Einkettenbildung, die durch SDS-PAGE/Western Blotting nachgewiesen werden kann. Das zeigt, dass erfindungsgemäß die Präparation des Proenzym in schneller und effizienter Weise mit hoher Ausbeute gelingt.

Bei Anwendung der vorstehend genannten Verfahrensschritte kann also sowohl die gereinigte, den Faktor VII aktivierende Protease, ihr Proenzym oder auch ein Gemisch aus der aktivierten Protease und dem Proenzym erhalten werden. Ein besonders empfehlenswerter Weg zur Herstellung einer reinen aktivierten Protease besteht in der chromatographischen Trennung der den Faktor VII aktivierenden Protease von ihrem Proenzym mittels stufenweiser Elution, bei der auf dem Trägermaterial eine Substanz immobilisiert ist, die unterschiedlich starke Bindungen zur Protease einerseits und zum Proenzym andererseits aufweist. Damit können unterschiedliche Eluate gewonnen werden, die entweder nur die aktivierte Protease oder nur das Proenzym enthalten.

Zur Gewinnung des Proenzym wird dabei auf der Matrix ein Inhibitor mit starke Affinität für die aktivierte Protease immobilisiert. Hierfür kommen vor allem Serinprotease-Inhibitoren, insbesondere der C1-Esterase-Inhibitor, das  $\alpha$ -2-Antiplasmin, das Antithrombin III (unter Beimischung von Heparin zur Auflöslösung) oder niedermolekulare, hochaffine Inhibitoren, die auch synthetischer Natur sein können, in Frage. Im Säulendurchfluss befindet sich dann das an der Matrix nicht oder weniger fest gebundene Proenzym. Hingegen wird zur Reindarstellung der aktivierten Protease ein Inhibitor auf der Matrix immobilisiert, der nur ein schwaches inhibitorisches Potential aufweist und die aktivierte Protease reversibel bindet. In diesem Fall wird nach dem Auswaschen des Proenzym die auf der Matrix gebundene aktive Protease eluiert und kann dann in reiner Form gewonnen werden. Für diese Verfahrensvariante eignet sich z. B. ein mit Aprotinin behandeltes Trägermaterial oder niedermolekulare, reversible Inhibitoren, die auch synthetischer Natur sein können.

Selbstverständlich können auch Antikörper oder deren Fragmente, die zwischen der aktivierten Protease und dem Proenzym unterscheiden können, für die Reindarstellung der genannten Proteine verwendet werden. Hierfür können vor allem monoklonale Antikörper eingesetzt werden, die "Neoepitope" nach Aktivierung der Protease erkennen können, also z. B. die Aktivierungs- oder Spaltstelle des Proteins.

Unter den erfindungsgemäß einzusetzenden affinitätschromatographischen Verfahren ist die Adsorption an Kalziumphosphat/Hydroxylapatit als eine einfache und schnelle Methode zur Anreicherung der Protease und/oder des Proenzym hervorzuheben. Dabei wird die Lösung, die die Protease und das Proenzym enthält, bei einem pH-Wert zwischen 2,5 und 9,0, vorzugsweise zwischen 2,5 und 7,2 mit

Kalziumphosphat versetzt. Nach anschließender Sedimentierung z. B. durch Zentrifugation oder durch Filtration wird das Sediment, ggf. nach ein- oder mehrfachem Resuspendieren in einer Pufferlösung unter Zugabe von bspw. 0,2 M Natriumcitrat eluiert. Die Protease und das Proenzym befinden sich dann im Eluat.

Auch die Adsorption der Protease an hydrophoben Matrices oder an hydrophoben Liganden, die an entsprechende Matrices gekoppelt sind, kann erfindungsgemäß verwendet werden. Beispiele sind Phenyl- oder Octyl-Sepharosen® oder ein an eine Matrix gekoppeltes Phenylalanin. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgt in an sich bekannter Weise mit einer gepufferten Lösung geringer Ionenstärke, die Phenylalanin, Glycerin oder Ethylenglykol enthalten kann.

Da die Protease und das Proenzym eine Wechselwirkung mit Kationen, vor allem mit Kalzium und Magnesiumionen eingehen, was durch eine Steigerung ihrer Aktivität in deren Gegenwart bestätigt wird, bietet sich zu deren Anreicherung aus entsprechenden Lösungen die Chromatographie mittels sogenannter "Chelat-Matrices" an. Chelatverbindungen mit Zink-, Kupfer- oder Nickelionen sind dabei besonders geeignet. Nach dem Waschen der mit der Protease beladenen Matrix kann zur Elution gebundener Proteine auch ein Imidazolpuffer, ggf. mit einem linearen Gradienten, eingesetzt werden. Das erfindungsgemäße Verfahren kann auch einen affinitätschromatographischen Reinigungsschritt enthalten, bei dem als Trägermaterial eine Matrix eingesetzt wird, auf der gegen die genannten Proteine gerichtete, monoklonale oder polyklonale Antikörper oder ihre F(ab)- oder ihre F(ab)<sub>2</sub>-Fragmente oder andere, zur reversiblen Bindung der genannten Proteine geeignete Substanzen immobilisiert sind.

Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren gewonnene Protease, ihr Proenzym oder das Gemisch beider Proteine kann mit oder ohne den Zusatz zusätzlicher Stabilisatoren im sauren pH-Bereich bei pH-Werten von etwa 2,5 bis 7,2 ohne Aktivitätsverlust gelagert werden, während im alkalischen Bereich ein Zusatz von Stabilisatoren zwingend ist.

Therapeutisch können die genannte aktivierte Protease, das Proenzym oder das Gemisch beider Verbindungen zur Unterstützung der Blutgerinnung bei Blutungsneigung, bei Mangel an Faktoren des endogenen Gerinnungssastes oder als FEIBA (= Factor VIII bypassing activity), aber auch zur endogenen und exogenen Aktivierung von Plasminogenaktivatoren wie der Prourokinase oder des Einketten-tPA verwendet werden. Diese Aktivität kann auch durch Anwendung der genannten Protease zur Prophylaxe oder Therapie von thromboembolischen Erkrankungen in Kombination mit Einketten- oder Zweiketten-Plasminogenaktivatoren oder Antikoagulantien eingesetzt werden. Krankheitsbilder, die mit thrombotischen Komplikationen vergesellschaftet sind, wie Herzinfarkt, Angina pectoris, Schlaganfall oder Beinvenenthrombosen können so erfolgreich behandelt werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist deshalb eine pharmazeutische Zubereitung, die eine zur Auflösung von fibrinhaltigen Thromben ausreichender Menge der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease und/oder deren Proenzymform enthält. Auch diese Zubereitung kann außerdem Einketten-Plasminogenaktivatoren und/oder Antikoagulantien enthalten. Zweckmäßigerweise wird der Zubereitung noch ein Proteinase-Stabilisator oder ein Reduktionsmittel wie Dithiothreitol, Mercaptoethanol oder Cystein zugesetzt, um das Risiko einer Polymerbildung während der Aufarbeitung oder bei der Lagerung zu reduzieren.

Auch bei Wundheilungsprozessen spielen fibrinolytische Prozesse eine Rolle. Dabei kann die genannte Protease und/

oder das Proenzym intravenös oder lokal, subkutan, intradermal, intramuskulär oder bei Verletzungen und Wunden als Bestandteil eines Fibrinklebers oder auch topisch oder gebunden an eine geeignete Trägermatrix z. B. in Form eines Vlieses oder eines Pflasters erfolgen, wobei eine Kombination mit Wachstumsfaktoren zweckmäßig sein kann. Im allgemeinen kommt eine derartige pharmazeutische Zubereitung in flüssiger oder lyophilisierter Form zur Anwendung, der an sich bekannte Proteindestabilisatoren zugesetzt werden können, also z. B. Komplexbildner, zweiwertige Kationen wie Kalzium, Aminosäuren wie Glutamat, Arginin, Lysin oder Glyzin und/oder Zucker wie Glukose, Arabinose, Mannose oder Mannitol.

Außerdem können die Protease und/oder ihr Proenzym auch zur Beschichtung von in den Organismus zu implantierenden, aus Kunststoffen oder Metallen bestehenden Gegenständen, wie künstlichen Herzklappen, Blutgefäßen, aber auch zur Blutentnahme oder künstlichen Ernährung eingeführten Kanülen eingesetzt werden.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele erläutert:

#### Beispiel 1

Reindarstellung mittels immobilisierter monoklonaler Antikörper

Monoklonale Antikörper, die gegen die den Faktor VII aktivierende Protease gerichtet sind, wurden an BrCN-Sepharose® gekoppelt. 30 ml dieser mAb-Matrix wurden in eine Säule gefüllt und das Harz mit 50 mM Natriumcitrat, 0,1 M Natriumchlorid NaCl, 0,1 M Arginin × HCl, pH 6,0, equilibriert.

100 ml Citratplasma wurden über die Säule gepumpt und die Matrix dann mit 50 mM Natriumcitrat, 1 M NaCl, 0,1 M Arginin × HCl, pH 6,0, gewaschen. Danach wurde die Säule mit dem Equilibrierungspuffer erneut gewaschen, woran sich die Elution mit 0,1 Glyzin, pH 2,5, anschloss. Das Eluat (ca. 30 ml) wurde in einer Vorlage von 3 ml einer 200 mM Natriumcitratlösung, pH 5,5 unter Rühren gesammelt und danach auf einen pH-Wert von 4,5 eingestellt.

Die Eluatlösung wurde zur weiteren Analyse verwendet. Es wurde eine SDS-PAGE mit anschließendem Transfer auf eine PVDF-Membran und eine Detektion der Faktor VII-Aktivator-Bande mit der nicht reduzierten und mit der reduzierten Probe durchgeführt. Aktivitätstests der so gewonnenen Proteine wurden entsprechend dem in der deutschen Patentanmeldung 199 26 531.3 beschriebenen Verfahren, nämlich der Aktivierung von Prourokinase und Faktor VII, mit anschließender Detektion von Urokinase oder dem aktivierten Faktor VII durchgeführt. Die in diesem System getesteten Proteasemengen, bestimmt als Proteaseantigen, entsprechen der erwarteten theoretischen Aktivität, wodurch die Aktivität der isolierten Protease oder des Proenzym hinsichtlich der biologischen Aktivität gezeigt wurde.

#### Beispiel 2

##### Anionenaustauscher-Chromatographie

Eine die Proenzymform der Faktor VII-aktivierenden Protease enthaltende Lösung, die noch Verunreinigungen durch andere Proteine enthielt, wurde in einer Pufferlösung aus 20 mM Na-Acetat, 0,1 M Glyzin, pH 4,5, auf eine Mono Q-Sepharose gepumpt und anschließend mit dem o. g. Puffer gewaschen. Die Durchlauf-Fraktion wurde aufgefangen. Die Elution gebundener Proteine erfolgte mit 20 mM Na-Acetat, 2 M NaCl, pH 4,5. Das Eluat wurde in einen Puffer

aus 5 mM Na-Citrat, 50 mM NaCl, pH 6,0, verdünnt und in den in Beispiel 1 genannten Testsystemen untersucht. Aliquots wurden bei 4 bis 8°C gelagert bzw. bei -20°C eingefroren.

Nach Lagerung der Eluatlösung bei 6°C für mehrere Tage wurden die Tests wiederholt, wobei die Verdünnungen der (aufgetauten) Proben jeweils kurz vor dem Test durchgeführt wurden.

SDS-PAGES/Western Blots bestätigten, dass die Protease in ihrer Proenzymform isoliert worden war. Nach SDS-PAGE und Anfärbung von Proteinen mittels Coomassie Blue waren in der Ausgangslösung (vor Chromatographie) neben der Protease eine Reihe von verunreinigenden Proteinen sichtbar, die ebenfalls in den Durchlaufaktionen zu finden waren. Die Protease stellte sich als eine Bande entsprechend der Proenzymform (also auch nach Reduktion) rein dar. Die Aktivitätstests (siehe Beispiel 1) bestätigten die Nativität der Protease im Sinne der Beibehaltung der biologischen Aktivitäten.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Reindarstellung der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease und/oder ihres Proenzym, **dadurch gekennzeichnet**, dass sie aus biologischen oder aus bei der gentechnologischen Herstellung anfallenden Flüssigkeiten
  - a) durch Anionen- und/oder Kationenaustauscher-Chromatographie bei einem pH-Wert unterhalb des isoelektrischen Punktes des zu isolierenden Proteins oder
  - b) durch eine Kombination der Anionen- oder Kationenaustauscher-Chromatographie mit einer Affinitätschromatographie und/oder einer fraktionierten Fällung bei pH-Werten zwischen 2,5 und 9,0, vorzugsweise zwischen 2,5 und 7,2, gewonnen werden, wobei die Affinitätschromatographie unter Verwendung von
    - Kalziumphosphat/Hydroxylapatit,
    - einer hydrophoben Matrix,
    - einer Chelatmatrix,
    - einer Matrix, die mit einem immobilisierten, gegen das zu isolierende Protein gerichteten, monoklonalen oder polyklonalen Antikörper oder seinen F(ab)- oder F(ab)<sub>2</sub>-Fragmenten beschichtet ist, durchgeführt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Reindarstellung in Gegenwart von einem oder mehreren Proteinstabilisatoren erfolgt, die ausgewählt werden aus
  - Lösungsvermittlern, vorzugsweise Hydroxyprolin,
  - Detergentien, vorzugsweise Tween® oder Triton®,
  - Proteinen, vorzugsweise Albumin, Gelatine, Fibronektin, Vibronektin oder ähnlichen Proteinen,
  - Reduktionsmitteln, vorzugsweise Dithiothreitol, Mercaptoethanol oder Cystein, und/oder
  - Proteinase-Inhibitoren wie Aprotinin,  $\alpha$ -2-Antiplasmin, C1-Esterase-Inhibitor, dem Inter- $\alpha$ -Trypsin-Inhibitor, dem AntithrombinIII/Heparin oder synthetischen Inhibitoren.
3. Verfahren nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass bei der Reindarstellung als weitere Proteinstabilisatoren
  - Komplexbildner zweiwertiger Ionen, vorzugsweise EGTA, EDTA oder Citrat, und/oder

- zweiwertige Ionen, vorzugsweise Kalziumionen, und/oder
  - Aminosäuren, vorzugsweise Glutamat, Arginin, Lysin oder Glyzin, und/oder
  - Zucker, vorzugsweise Glukose, Arabinose, Mannose oder Mannit, und/oder
  - Alkohole, vorzugsweise Ethylenglykol oder Polyethylenglykol,
- eingesetzt werden.

4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass zur chromatografischen Trennung der den Faktor VII aktivierenden Protease von ihrem Proenzym mittels stufenweiser Elution auf dem Trägermaterial eine Substanz immobilisiert wird, die unterschiedlich starke Bindungen zur Protease einerseits und zum Proenzym andererseits aufweist, und die unterschiedlichen Eluate dann getrennt voneinander aufgefangen und aus ihnen das jeweilige Protein isoliert wird.

5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass die fraktionierte Fällung der Protease und/oder ihres Proenzym aus ihrer Lösung durch Zusatz von

- Polyethylenglykol ab einer Konzentration von mindestens 10 Gew.-% oder
- Ammoniumsulfat ab einer Konzentration von mindestens 15 Gew.-% erfolgt.

6. Pharmazeutische Zubereitung, **dadurch gekennzeichnet**, dass sie die den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierende Protease und/oder ihr Proenzym zusammen mit einem oder mehreren Proteinstabilisatoren gemäß den Ansprüchen 2 und 3 enthält, zur Unterstützung der Blutgerinnung bei Blutungsneigung, bei Mangel an Faktoren des endogenen Gerinnungsweges, als FEIBA, zur Prophylaxe und/oder Therapie von mit thrombotischen Komplikationen vergesellschafteten Krankheitsbildern, bei angeborenen oder erworbenen Mangelzuständen an der Protease oder ihrem Proenzym, zur Unterstützung der Wundheilung allein oder als Bestandteil eines Fibrinklebers, eines Vlieses oder in Kombination mit Wachstumsfaktoren, zur subkutanen oder intramuskulären, intravenösen oder topischen Behandlung.

7. Verwendung der pharmazeutischen Zubereitung des Anspruchs 6, zur Beschichtung von Oberflächen von in den Organismus zu implantierenden, aus Kunststoff oder Metallen bestehenden Gegenständen, wie künstlichen Herzklappen, Blutgefäßen oder auch zur Blutentnahme oder zur künstlichen Ernährung eingeführten Kanülen.

8. Reagenz enthaltend die dem Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease und/oder ihr Proenzym zusammen mit einem oder mehreren Proteinstabilisatoren gemäß den Ansprüchen 2 und 3 zur Verwendung in biologischen Testsystemen und zum Antigennachweis.

AVENTIS BEHRING GMBH

1999/Z011 - Ma 1212 - C41

**Process for the preparation in pure form of the protease activating blood clotting factor VII, its proenzyme or a mixture of both proteins by means of ion-exchange chromatography**

The invention relates to a process for the preparation in pure form of the protease activating blood clotting factor VII, its proenzyme or a mixture of both proteins, and of pharmaceutical preparations which contain the proteins mentioned individually or as a mixture.

German patent application 19 903 693.4 has already disclosed a protease for the activation of blood clotting factor VII, a process for its production, for its detection and for its inactivation, and pharmaceutical preparations which contain this protease. This protease, first isolated from plasma, occurs there together with a nonactivated form, which is designated below as "proenzyme". The protease activates blood clotting factor VII and accelerates clotting, as has been shown by numerous experiments. In the further investigation of the biological properties of this protein, identified as serine protease, it emerged that single-chain plasminogen activators, such as prourokinase, are also effectively activated. Moreover, inactivation of factors V and VIII in vitro was observed. In addition to the sequenced regions already described in German patent application 19 903 693.4, N-terminal sequencings of protease fractions were carried out. The following amino acid sequences characterize the FVII-activating protease: IYGGFKSTAGKHP; LLESLDPDXTPD; EFHEQSFRVEKI; SKFTXAXPXQFK; where X means not identified. The sequences of the protease mentioned elucidated up to now show that they agree 100% with sequences of the protease published by Choi-Miura (Choi-Miura et al. J. Biochem. 1996; 119: 1157 to 1165).

The investigations until now have especially concentrated on the protease in its activated form. The inactive form of the protease present in the plasma as a proenzyme was only recently discovered by means of a protein band pattern in the SDS-PAGE after reduction of the sample. Since, on the activation of the protease, cleavage and thus activation take place at a site of the primary structure typical for serine proteases two or more bands are visible on electrophoresis. On reduction of the chains which are connected by disulfide bridges, the individual bands become recognizable in accordance with their lower molecular weight, the proenzyme remaining as a large individual chain. This also became clear in more complex solutions after transfer of the proteins to membranes and subsequent Western blotting using suitable antibodies.

For therapeutic reasons, there is now an interest in having available both the protease in its activated form and the proenzyme, in addition to the mixture of the two proteins mentioned. Whereas the activated protease can be used for the rapid activation of blood clotting factor VII or the single-chain plasminogen activators in order to influence acute syndromes, the proenzyme form of the protease is especially to be chosen as a preferred agent for medium- to longer-term prophylaxis or treatment of inherited or acquired deficiency states or alternatively for increasing the plasma level beyond the physiological extent. However, it is to be taken into account here that the stabilization of an activated protease is difficult, since, for example, self-degradation can take place or the molecule can be unstable on account of its structural conditions. Previous studies have shown that the protease activating factor VII can be isolated and stabilized in its proenzyme form only under special circumstances.

The previous investigations have shown that the biological activities of this protease can be increased by calcium and/or heparin or substances related to

the latter. This property has already been previously used in order to adsorb the protease on immobilized heparin and to obtain an enriched fraction. Moreover, it is already known that anion-exchange chromatography is also suitable for the

purification of the protease. The combination of both purification steps is suitable for obtaining the protease in enriched form. The use of an aprotinin matrix can also be used for the preparation in pure form of the activated protease.

A process for the preparation in pure form and simultaneous stabilization of the protease activating blood clotting factor VII and/or its proenzyme has now been found, in which they are obtained from biological fluids or those obtained in the case of preparation by genetic engineering by

- a) anion- and/or cation-exchange chromatography at a pH below the isoelectric point of the protein to be isolated or
- b) a combination of anion- or cation-exchange chromatography with affinity chromatography

and/or fractional precipitation at pHs of between 2.5 and 9.0, preferably between 2.5 and 7.2, the affinity chromatography being carried out using calcium phosphate/hydroxyapatite

- a hydrophobic matrix,
- a chelate matrix,
- a matrix which is coated with an immobilized monoclonal or polyclonal antibody directed against the protein to be isolated, or its F(ab) or F(ab)<sub>2</sub> fragments.

A particularly suitable method for the preparation in pure form of the protease and/or its proenzyme is anion- and/or cation-exchange chromatography. The use of these methods for the preparation in pure form of the activated protease was admittedly proposed earlier, but the process conditions previously used did not produce completely satisfactory results. This is principally due to the fact that the risk of the activation of the proenzyme on contact with the surfaces of the matrices is very high. The object was therefore to develop a process which



makes possible the preparation of the activated protease and of the proenzyme in a pure and stable form.

Surprisingly, it was then shown that very low pHs, in particular pHs between 2.5 and 7.2, damage neither the activated form of the protease nor the proenzyme and can therefore be employed to good effect in the adsorption and elution. By this means, almost trouble-free handling of the protease activating factor VII is made possible, since most other proteases circulating in the plasma are not active or only very slightly active in the acidic medium and the risk of proteolytic activation is thus minimized. The danger of the self-degradation of the protease is also decreased in this way. Since, as is known, extremely acidic pHs could include the risk of denaturation and thus bring about a loss in activity of the protease, the activity of the protease obtained from a strongly acidic medium was measured, for example, by a photometric determination of the extinction occurring in the case of action on chromogenic substrates. It was shown in this case that both the protease and its proenzyme can be handled without loss of activity in the short term, up to a pH of 2.0. At a pH of 2.5 to approximately 7.2, the protease and its proenzyme can be stored for several months, the highest stabilities being observed at a pH of below 6.5.

In this case it was surprisingly found that anion- and/or cation-exchange chromatography at the low pHs mentioned can be used for the purification of the protease and of the proenzyme. This is so remarkable because in this case adsorption is possible on the exchanger matrices at pHs which lie below the isoelectric point of the protease or of the proenzyme.

Up to now, there is still no scientific explanation of on which interactions this adsorption is based. However, it is possible by means of this adsorption in the acidic medium to remove a large number of impurities which do not bind to the matrices at these pHs. A considerable enrichment of the protease on the matrix is thus achieved. After washing the matrix, the protease and/or the proenzyme can be eluted by an increase in the ionic strength.

For the preparation in pure form of the abovementioned proteins, the anion- and/or cation-exchange chromatography can be combined with affinity chromatography and/or fractional precipitation. Independently of whether the abovementioned purification processes are employed individually or in any desired combination, it is recommended additionally to add protease inhibitors in all process steps, in order to block cleavage of the proenzyme into the activated protease. Suitable protein stabilizers which are added in this case are

- solubilizers, preferably hydroxyproline,
- detergents, preferably Tween<sup>®</sup> or Triton<sup>®</sup>,
- proteins, preferably albumin, gelatin, fibronectin and vitronectin or similar proteins,
- reductants, preferably dithiothreitol, mercaptoethanol or cysteine, and/or
- proteinase inhibitors such as aprotinin,  $\alpha$ -2-antiplasmin, C1-esterase inhibitor, inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor, antithrombin III/heparin or synthetic inhibitors.

A particularly good stabilization can be achieved during the preparation in pure form of the protease and of the proenzyme if, as further protein stabilizers,

- complexing agents of divalent ions, preferably EGTA, EDTA or citrate and/or
- divalent ions, preferably calcium ions, and/or
- amino acids, preferably glutamate, arginine, lysine or glycine, and/or
- sugars, preferably glucose, arabinose, mannose or mannitol, and/or

- alcohols, preferably ethylene glycol or polyethylene glycol,

are added.

The abovementioned process steps can also additionally be combined with fractional precipitation of the protease and/or its proenzyme from its solution, which is carried out by addition of

- polyethylene glycol from a concentration of at least 10% by weight or
- ammonium sulfate from a concentration of at least 15% by weight.

It is particularly worthy of note that in the processes described above the proenzyme form of the protease can also be obtained in pure form. As a matter of fact, it was seen that ion-exchange chromatography, under the said acidic conditions, using a solution which especially contained the proenzyme, led to an eluate which contained the proenzyme exclusively or at least to a very greatly enriched extent. In this case, the nativity of the proenzyme thus obtained can be determined with the aid of one of the activity tests which are described in German patent application 196 26 531.3. i.e., for example, by the photometric determination of the extinction occurring on action on chromogenic substrates or by the single-chain formation occurring after reduction of the sample, which can be detected by SDS-PAGE/Western blotting. This shows that according to the invention the preparation of the proenzyme is possible in a rapid and efficient manner and with a high yield.

When using the abovementioned process steps, it is thus possible to obtain both the purified protease activating factor VII, its proenzyme or alternatively a mixture of the activated protease and the proenzyme. A route which is particularly worthy of recommendation for the preparation of a pure activated protease consists in the chromatographic separation of the protease activating factor VII from its proenzyme by means of stepwise elution, in which a substance

is immobilized on the support material which has bonds of different strength to the protease on the one hand and to the proenzyme on the other hand. Different eluates can thus be obtained which contain either only the activated protease or only the proenzyme.

To obtain the proenzyme, an inhibitor with strong affinity for the activated protease is in this case immobilized on the matrix. Serine protease inhibitors, in particular C1 esterase inhibitor,  $\Delta$ -2 antiplasmin, antithrombin III (with admixture of heparin to the application solution) or low molecular weight, high-affinity inhibitors, which can also be of synthetic nature, are especially suitable for this. The proenzyme which is not bound or less firmly bound to the matrix is then found in the solution flowing through the column. On the other hand, for the preparation in pure form of the activated protease, an inhibitor is immobilized on the matrix which only has a weak inhibitory potential and reversibly binds the activated protease. In this case, after washing off the proenzyme, the active protease bound to the matrix is eluted and can then be obtained in pure form. A suitable support material for this process variant is, for example, one treated with aprotinin or low molecular weight, reversible inhibitors, which can also be of synthetic nature.

Of course, antibodies or fragments thereof, which can differ between the activated protease and the proenzyme, can also be used for the preparation of the said proteins in pure form. For this, monoclonal antibodies can especially be employed which can recognize "neoepitopes" after activation of the protease, i.e., for example, the activation or cleavage site of the protein.

Under the affinity-chromatography processes to be employed according to the invention, adsorption on calcium phosphate/hydroxyapatite is to be emphasized as a simple and rapid method for the enrichment of the protease and/or of the proenzyme. In this case, the solution which contains the protease and the proenzyme is mixed with calcium phosphate at a pH of between 2.5 and 9.0, preferably between 2.5 and 7.2. After subsequent sedimentation, e.g. by

centrifugation or by filtration, the sediment, if appropriate after resuspending one or more times in a buffer solution, is eluted with addition of, for example, 0.2 M sodium citrate. The protease and the proenzyme are then found in the eluate.

The adsorption of the protease on hydrophobic matrices or on hydrophobic ligands which are coupled to appropriate matrices can also be used according to the invention. Examples are phenyl- or octyl-Sepharoses® or a phenylalanine coupled to a matrix. The elution of the bound protein is carried out in a manner known per se using a buffered solution of low ionic strength, which can contain phenylalanine, glycerol or ethylene glycol.

Since the protease and the proenzyme enter into an interaction with cations, especially with calcium and magnesium ions, which is confirmed by an increase in their activity in the presence thereof, chromatography by means of so-called "chelate matrices" suggests itself for enrichment thereof from corresponding solutions. Chelate compounds with zinc, copper or nickel ions are particularly suitable in this case. After the washing of the matrix loaded with the protease, an imidazole buffer can also be employed for the elution of bound proteins, if appropriate with a linear gradient.

The process according to the invention can also contain an affinity-chromatography purification step in which the support material employed is a matrix on which monoclonal or polyclonal antibodies directed against the said proteins, or their F(ab) or their F(ab)<sub>2</sub> fragments or other substances suitable for the reversible binding of the said proteins, are immobilized.

The protease obtained by the process according to the invention, its proenzyme or the mixture of both proteins can be stored without loss of activity in the acidic pH range at pHs of approximately 2.5 to 7.2 with or without the addition of additional stabilizers, while in the alkaline range addition of stabilizers is necessary.

Therapeutically, the said activated protease, the proenzyme or the mixture of both compounds can be used to assist blood clotting in the case of a tendency to bleeding, in the case of absence of factors of the endogenous clotting branch or as FEIBA (= factor VIII bypassing activity), but also for the endogenous and exogenous activation of plasminogen activators such as prourokinase or single-chain tPA. This activity can also be employed in combination with single-chain or double-chain plasminogen activators or anticoagulants by use of the said protease for the prophylaxis or therapy of thromboembolic disorders. Syndromes which are associated with thrombotic complications, such as cardiac infarct, angina pectoris, stroke or leg vein thromboses, can thus be successfully treated.

A further subject of the invention is therefore a pharmaceutical preparation which contains an amount of the protease activating blood clotting factor VII and/or its proenzyme form sufficient for the dissolution of fibrin-containing thrombi. This preparation can also moreover contain single-chain plasminogen activators and/or anticoagulants. Expediently, a proteinase stabilizer or a reductant such as dithiothreitol, mercaptoethanol or cysteine is additionally added to the preparation in order to reduce the risk of polymer formation during processing or on storage.

Fibrinolytic processes also play a part in wound-healing processes. In this case, the said protease and/or the proenzyme can be administered intravenously or locally, subcutaneously, intradermally, intramuscularly or, in the case of injuries and wounds, as a constituent of a fibrin adhesive or alternatively topically or bound to a suitable carrier matrix, e.g. in the form of a web or of a patch, where combination with growth factors can be expedient. In general, a pharmaceutical preparation of this type is used in liquid or lyophilized form, to which protein stabilizers known per se can be added, i.e., for example, complexing agents, divalent cations such as calcium, amino acids such as glutamate, arginine, lysine or glycine and/or sugars such as glucose, arabinose, mannose or mannitol.

Moreover, the protease and/or its proenzyme can also be employed for the coating of articles, consisting of plastics or metals, to be implanted in the body, such as synthetic heart valves, blood vessels, but also cannulas inserted for taking blood or for artificial feeding.

The invention is illustrated by the following examples:

### Example 1

#### **Preparation in pure form by means of immobilized monoclonal antibodies**

Monoclonal antibodies which are directed against the protease activating factor VII were coupled to BrCN-Sepharose®. 30 ml of this mAb matrix were packed into a column and the resin was equilibrated with 50 mM sodium citrate, 0.1 M sodium chloride (NaCl), 0.1 M arginine × HCl, pH 6.0.

100 ml of citrate plasma were pumped through the column and the matrix was then washed with 50 mM sodium citrate, 1 M NaCl, 0.1 M arginine × HCl, pH 6.0. The column was then washed again with the equilibration buffer, after which elution with 0.1 M glycine, pH 2.5, followed. The eluate (about 30 ml) was collected in a volume of 3 ml of a 200 mM sodium citrate solution, pH 5.5, with stirring and then adjusted to a pH of 4.5.

The eluate solution was used for further analysis. An SDS-PAGE with subsequent transfer to a PVDF membrane and detection of the factor VII activator band was carried out using the unreduced and using the reduced sample. Activity tests of the proteins thus obtained were carried out according to the process described in German patent application 199 26 531.3, namely the activation of prourokinase and factor VII, with subsequent detection of urokinase or activated factor VII. The amounts of protease tested in this system, determined as protease antigen, correspond to the expected theoretical activity, whereby the activity of the isolated protease or of the proenzyme with respect to the biological activity was shown.



## Example 2

### **Anion-exchange chromatography**

A solution containing the proenzyme form of the factor VII-activating protease which still contained contaminations by other proteins was pumped onto a Mono Q Sepharose in a buffer solution of 20 mM Na acetate, 0.1 M glycine, pH 4.5 and then washed with the abovementioned buffer. The fraction passing through was collected. Bound proteins were eluted using 20 mM Na acetate, 2 M NaCl, pH 4.5. The eluate was diluted in a buffer of 5 mM Na citrate, 50 mM NaCl, pH 6.0, and investigated in the test systems mentioned in Example 1. Aliquots were stored at 4 to 8°C or frozen at -20°C.

After storage of the eluate solution at 6°C for several days, the tests were repeated, the dilutions of the (thawed) samples in each case being carried out shortly before the test.

SDS-PAGEs/Western blots confirmed that the protease had been isolated in its proenzyme form. After SDS-PAGE and staining of proteins by means of Coomassie Blue, in addition to the protease a number of contaminating proteins, which were also to be found in the fractions flowing through, were visible in the starting solution (before chromatography). The protease was represented as a band corresponding to the proenzyme form (i.e. even after reduction) in pure form. The activity tests (see Example 1) confirmed the nativity of the protein in the sense of the retainment of the biological activities.

AVENTIS BEHRING GMBH

1999/ZO11 - Ma 1212 - C41

**Patent Claims:**

1. A process for the preparation in pure form of the protease activating blood clotting factor VII and/or its proenzyme, **wherein** they are obtained from biological fluids or those obtained in the case of preparation by genetic engineering
  - a) by anion- and/or cation-exchange chromatography at a pH below the isoelectric point of the protein to be isolated or
  - b) by a combination of anion- or cation-exchange chromatography with affinity chromatography and/or fractional precipitation at pHs of between 2.5 and 9.0, preferably between 2.5 and 7.2, the affinity-chromatography separation processes being carried out using
    - calcium phosphate/hydroxyapatite
    - a hydrophobic matrix,
    - a chelate matrix,
    - a matrix which is coated with an immobilized monoclonal or polyclonal antibody directed against the protein to be isolated, or its F(ab) or F(ab)<sub>2</sub> fragments.
2. The process as claimed in claim 1, **wherein** the preparation in pure form is carried out in the presence of one or more protein stabilizers which are selected from the groups consisting of

- solubilizers, preferably hydroxyproline,
  - detergents, preferably Tween<sup>®</sup> or Triton<sup>®</sup>,
  - proteins, preferably albumin, gelatin, fibronectin, vitronectin or similar proteins,
  - reductants, preferably dithiothreitol, mercaptoethanol or cysteine, and/or
  - proteinase inhibitors such as aprotinin,  $\alpha$ -2-antiplasmin, C1-esterase inhibitor, the inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor, the antithrombin III/ heparin or synthetic inhibitors.
3. The process as claimed in claim 2, **wherein**, in the preparation in pure form, further protein stabilizers which are employed are
- complexing agents of divalent ions, preferably EGTA, EDTA or citrate and/or
  - divalent ions, preferably calcium ions, and/or
  - amino acids, preferably glutamate, arginine, lysine or glycine, and/or
  - sugars, preferably glucose, arabinose, mannose or mannitol, and/or
  - alcohols, preferably ethylene glycol or polyethylene glycol,
4. The process as claimed in claims 1 to 3, **wherein**, for the chromatographic separation of the protease activating factor VII from its proenzyme by means of stepwise elution, a substance is immobilized on the support material which has bonds of different strength to the protease

on the one hand and to the proenzyme on the other hand, and the different eluates are then collected separately from one another and the respective protein is isolated from them.

5. The process as claimed in claims 1 to 4, **wherein** the fractional precipitation of the protease and/or its proenzyme from its solution is carried out by addition of
  - polyethylene glycol from a concentration of at least 10% by weight or
  - ammonium sulfate from a concentration of at least 15% by weight.
6. A pharmaceutical preparation, **which comprises** the protease activating blood clotting factor VII and/or its proenzyme together with one or more protein stabilizers as set forth in claims 2 and 3, for assisting blood clotting in the case of a tendency to bleeding, in the case of absence of factors of the endogenous clotting pathway, as FEIBA or for the prophylaxis and/or therapy of syndromes associated with thrombotic complications, in inherited or acquired deficiency states of the protease or its proenzyme, for assisting wound healing alone or as a constituent of a fibrin adhesive, a web or in combination with growth factors, for subcutaneous or intramuscular, intravenous or topical treatment.
7. The use of the pharmaceutical preparation of claim 6 for the coating of surfaces of articles, consisting of plastic or metals, to be implanted in the body, such as synthetic heart valves, blood vessels or cannulas inserted for taking blood or for artificial feeding.
8. A reagent comprising the protease activating blood clotting factor VII and/or its proenzyme together with one or more protein stabilizers as set forth in claims 2 and 3 for use in biological test systems and for antigen detection.

AVENTIS BEHRING GMBH

1999/Z011 - Ma 1212 - C41

Abstract

**Process for the preparation in pure form of the protease activating blood clotting factor VII, its proenzyme or a mixture of both proteins by means of ion-exchange chromatography**

A process for the preparation in pure form of the protease activating blood clotting factor VII and/or its proenzyme is described in which these are obtained from biological fluids or those obtained in the case of preparation by genetic engineering

a) by anion- or cation-exchange chromatography at a pH below the isoelectric point of the protein to be isolated or

b) by a combination of anion- or cation-exchange chromatography with affinity chromatography and/or fractional precipitation at pHs of between 2.5 and 9.0, preferably between 2.5 and 7.2, the affinity chromatography being carried out using

- calcium phosphate/hydroxyapatite
- a hydrophobic matrix,
- a chelate matrix,
- a matrix which is coated with an immobilized monoclonal or polyclonal antibody directed against the protein to be isolated, or its F(ab) or F(ab)<sub>2</sub> fragments.

A pharmaceutical preparation and a reagent are moreover described which contain the said protease and its proenzyme.

AVENTIS BEHRING GMBH

1999/ZO11 - Ma 1212 - C41

**Patent Claims for USA:**

1. A process for the preparation in pure form of the protease activating blood clotting factor VII and/or its proenzyme, **wherein** they are obtained from biological fluids or those obtained in the case of preparation by genetic engineering
  - a) by anion- and/or cation-exchange chromatography at a pH below the isoelectric point of the protein to be isolated or
  - b) by a combination of anion- or cation-exchange chromatography with affinity chromatography and/or fractional precipitation at pHs of between 2.5 and 9.0, preferably between 2.5 and 7.2, the affinity-chromatography separation processes being carried out using
    - calcium phosphate/hydroxyapatite
    - a hydrophobic matrix,
    - a chelate matrix,
    - a matrix which is coated with an immobilized monoclonal or polyclonal antibody directed against the protein to be isolated, or its F(ab) or F(ab)<sub>2</sub> fragments.
2. The process as claimed in claim 1, **wherein** the preparation in pure form is carried out in the presence of one or more protein stabilizers which are selected from

- solubilizers, preferably hydroxyproline,
  - detergents, preferably Tween<sup>®</sup> or Triton<sup>®</sup>,
  - proteins, preferably albumin, gelatin, fibronectin, vitronectin or similar proteins,
  - reductants, preferably dithiothreitol, mercaptoethanol or cysteine, and/or
  - proteinase inhibitors such as aprotinin,  $\alpha$ -2-antiplasmin, C1-esterase inhibitor, the inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor, the antithrombinIII/heparin or synthetic inhibitors.
3. The process as claimed in claim 2, **wherein**, in the preparation in pure form, further protein stabilizers which are employed are
- complexing agents of divalent ions, preferably EGTA, EDTA or citrate and/or
  - divalent ions, preferably calcium ions, and/or
  - amino acids, preferably glutamate, arginine, lysine or glycine, and/or
  - sugars, preferably glucose, arabinose, mannose or mannitol, and/or
  - alcohols, preferably ethylene glycol or polyethylene glycol.
4. The process as claimed in claims 1, **wherein**, for the chromatographic separation of the protease activating factor VII from its proenzyme by

means of stepwise elution, a substance is immobilized on the support material which has bonds of different strength to the protease on the one hand and to the proenzyme on the other hand, and the different eluates are then collected separately from one another and the respective protein is isolated from them.

5. The process as claimed in claim 1, **wherein** the fractional precipitation of the protease and/or its proenzyme from its solution is carried out by addition of
  - polyethylene glycol from a concentration of at least 10% by weight or
  - ammonium sulfate from a concentration of at least 15% by weight.
6. A pharmaceutical preparation, **which comprises** the protease activating blood clotting factor VII and/or its proenzyme together with one or more protein stabilizers as set forth in claims 2 and 3, for assisting blood clotting in the case of a tendency to bleeding, in the case of absence of factors of the endogenous clotting pathway, as FEIBA or for the prophylaxis and/or therapy of syndromes associated with thrombotic complications, in inherited or acquired deficiency states of the protease or its proenzyme, for assisting wound healing alone or as a constituent of a fibrin adhesive, a web or in combination with growth factors, for subcutaneous or intramuscular, intravenous or topical treatment.
7. The use of the pharmaceutical preparation of claim 6 for the coating of surfaces of articles, consisting of plastic or metals, to be implanted in the body, such as synthetic heart valves, blood vessels or cannulas inserted for taking blood or for artificial feeding.
8. A reagent comprising the protease activating blood clotting factor VII and/or its proenzyme together with one or more protein stabilizers as set forth in claims 2 and 3 for use in biological test systems and for antigen detection.